





MASS PRODUCTION OF DNA PROBE**Publication number:** JP61227785**Publication date:** 1986-10-09**Inventor:** NANIBUFUSHIYAN DATSUTAGUPUTA; PIITAA REI;
DONARUDO KUROZAAZU; TOMASU BAANETSUTO**Applicant:** MOLECULAR DIAGNOSTICS INC**Classification:****- international:** C07H21/00; C12Q1/68; C07H21/00; C12Q1/68; (IPC1-7): C07H21/00; C12N15/00; C12P19/34; C12Q1/68; G01N33/50**- european:** C07H21/00C4; C12Q1/68D4; C12Q1/68M**Application number:** JP19850265160 19851127**Priority number(s):** US19840675386 19841127**Also published as:** EP0184056 (A2)
 US4734363 (A1)
 EP0184056 (A3)
 EP0184056 (B1)**Report a data error here**

Abstract not available for JP61227785

Abstract of corresponding document: **US4734363**

A process for production of a single strand of a nucleic acid comprising covalently linking to a solid substrate a polynucleotide complementary to the desired strand, hybridizing said polynucleotide with an oligonucleotide, extending the oligonucleotide in direction away from said substrate, denaturing the hybridized polynucleotide and extended oligonucleotide, thereby to free the extended oligonucleotide from the solid substrate, and separating the extended oligonucleotide. The product can be used for making analytical probes.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-227785

⑤ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

③ 公開 昭和61年(1986)10月9日

C 12 N 15/00
C 07 H 21/00
C 12 P 19/34

7115-4B
6742-4C
8515-4B

※審査請求 未請求 発明の数 3 (全7頁)

⑭ 発明の名称 DNAプローブの大規模生産

⑰ 特 願 昭60-265160

⑱ 出 願 昭60(1985)11月27日

優先権主張 ⑳ 1984年11月27日㉑ 米国(US)㉒ 675386

⑲ 発 明 者 ナニブフシヤン・ダツ アメリカ合衆国コネチカット州06511ニューヘブン・プロ
タグプタ スペクトストリート 470⑲ 発 明 者 ビーター・レイ アメリカ合衆国コネチカット州06517ハムデン・イングラ
ムストリート 71⑲ 出 願 人 モレキュラー・ダイア アメリカ合衆国コネチカット州06516ウエストヘブン・モ
グノステイツクス・イ ーガンレイ 400
ンコーポレーテッド⑲ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

DNAプローブの大規模生産

2. 特許請求の範囲

1. 固体の基体、前記固体の基体に一端で共有結合した一本鎖のポリヌクレオチド、および前記ポリヌクレオチドにハイブリッド化させたオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする特異的核酸鎖の生産用構造体。

2. 前記オリゴヌクレオチドが少なくとも5つのヌクレオチド残基からなる特許請求の範囲第1項記載の構造体。

3. 前記ポリヌクレオチドの3'-末端が固体の基体に結合されている特許請求の範囲第1または2項記載の構造体。

4. 前記結合が $\begin{array}{c} | \\ -N-C- \\ | \end{array}$ 結合を含有する特許請求の範囲第1~3項のいずれかに記載の構造体。

5. 固体の基体、前記固体の基体に一端で共有結合した一本鎖の第1のポリヌクレオチド、および第1のポリヌクレオチドにハイブリッド化した第2のポリヌクレオチドからなり、1つのポリヌクレオチドの一端が第2のポリヌクレオチドの他端に対して相補的であることを特徴とする特異的核酸鎖の生産用構造体。

6. 第1のポリヌクレオチドの3'-末端が前記固体の基体に結合しており、前記結合が $\begin{array}{c} | \\ -N- \\ | \\ C- \\ | \end{array}$ 結合を含有する特許請求の範囲第5項記載の構造体。

7. 固体の基体に所望の鎖に対して相補的であるポリヌクレオチドを共有結合させ、前記ポリヌクレオチドをオリゴヌクレオチドとハイブリッド化させ、前記基体から離れる方向に前記オリゴヌクレオチドを伸長させ、ハイブリッド化したオリゴヌクレオチドおよび伸長されたオリゴヌクレオ

チドを変性し、これにより前記固体の基体から伸長されたオリゴヌクレオチドを遊離させ、そして伸長されたオリゴヌクレオチドを分離することを特徴とする核酸の一本鎖を生産する方法。

8. 共有結合したオリゴヌクレオチドを支持する固体の支持体を再循環する工程をさらに含む特許請求の範囲第7項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は特異的核酸の配列を大規模生産する方法に関する。

核酸配列の大規模生産は、通常特定の配列を特異的ベクター中でクローニングすることによって実施される。クローニングすべき配列を単離し、同定し、次いで一本鎖または二本鎖のベクターに共有的に結合する。余分のDNAをもつベクターを宿主細胞から分離しそして、要件に依存して、DNAのクローニングした片を制限し、そしてDNAの残部から分離しなくてはならない。一本鎖DNAを必要とする場合、それを一本鎖ベクター

中でクローニングするか、あるいは鎖セパレーター (strand separator) を必要とする。すべての技術は生物化学的系および生物学的系の熟練した操作を必要とする。

アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 140, 95-103 (1984) は、一本鎖DNA鎖型をセルロースに非特異的に固定化することによって、DNAハイブリダイゼーションプローブを生産する方法を記載している。この方法は有用であるが、新しく合成された生成物DNAの長さ分布は所望なほど均一ではない。これはセルロースへの鎖型DNAの多数回の付着のためであろうと現在思われている。

したがって、本発明の目的は、プラスミド、クローニングおよび制限を連続的に必要としないで、特異的核酸配列を比較的大規模で合成することである。

この目的および他の目的および利点は、本発明

に従い実現され、本発明によれば、固体の基体 (solid substrate) に所望の鎖に対して相補的であるポリヌクレオチドに共有結合させ、前記ポリヌクレオチドをオリゴヌクレオチドとハイブリッド化させ、前記基体から離れる方向に前記オリゴヌクレオチドを伸長させ、ハイブリッド化したオリゴヌクレオチドおよび伸長されたオリゴヌクレオチドを変性し、これにより前記固体の基体から伸長されたオリゴヌクレオチドを遊離させ、そして共有結合したポリヌクレオチドを支持する固体の支持体から伸長されたオリゴヌクレオチドを分離することからなり、次いで前記支持体をこの方法の初期の工程に再循環する特徴とする核酸の一本鎖を生産する方法が提供される。

固体の基体、前記固体の基体に共有結合した一本鎖のポリヌクレオチド、および前記ポリヌクレオチドにハイブリッド化したオリゴヌクレオチドからなる中間生成物は、また、新規である。

さらに、好ましい方法のフローシートである添付図面を参照しながら本発明を説明する。

固体の支持体 (solid support) 10 は合成すべき所望の鎖に対して相補的であるDNA鎖12に共有結合されており、DNA鎖は固体の支持体に隣接した3'-末端を有する。生産物14は既知である。

次いで所望の鎖の5'-末端に対応するオリゴヌクレオチド16は、生産物14の鎖12にハイブリッド化する。この固体の新規な中間体18はヌクレオシドトリホスフェートおよびDNAポリマラーゼのクレナウ (Klenow) 断片を含有する溶液と接触させ、次いでオリゴヌクレオチドはその3'-末端において生長し、DNA鎖12が鎖型としてはたらいた後、12に対して塩基対である所望の鎖20を生産する。伸長されたオリゴヌクレオチドに対して塩基対であるポリヌクレオチドを構成する構造体を変性して鎖20を溶液へ開放し、次いで鎖溶液を、例えば、遠心によ

り、生産物から分離し、次いでこの方法において初期の工程へ再循環する。

所望の鎖20は既知の方法でその溶液から回収することができる。

本発明をさらに詳細に記載すると、固体の支持体はセルロース、セファデックス (Sephadex) またはセファローズ (Sephacrose)、紙片、ナイロン、あるいはアミンまたはアルデヒドまたは同様な残基と反応させるために使用できる他のものであることができる。

核酸を固体の支持体へ既知の方法で結合する。例えば、後者はアルデヒドまたはアミンと反応性の基を提供し、これらの基は核酸上に提供されたアミンまたはアルデヒドの基と反応することができ、次いでそれらを水素化ホウ素化物で還元して支持体と核酸との間のアミノメチレン結合体 (joiner) を形成する。これは欧州特許出願第85 101 407.6号中に詳述されている。この結合は、また、ホスフェートエステ

トにより、あるいはある変性剤、例えば、水酸化ナトリウム溶液、ホルムアルデヒドまたはジメチルスルホキシドを添加することにより、新しく合成されたDNA鎖を分離することができる。

固定化された核酸を支持する固体の支持体を、所望の鎖を含有する溶液から、例えば、濾過および/または遠心により分離し、そして固体の支持体を、必要に応じて、洗浄後再循環することができる。

所望の鎖を含有する上澄み液を透析、アルコール沈殿などにかけて純粋な鎖を得、次いでこれを既知の方法で使用するすることができる。1つのこのような用途は、欧州特許出願第84 107 248.1号中に詳述されているように、診断試験のためのプローブを作るための使用である。

次の例示的実施例により、本発明のさらに説明する。これらの実施例において、特記しないかぎりあるいは文脈から明らかなように、部は重量による。

ルなどであることができる。

遺伝子プローブまたはコピーすべき遺伝子を固定化した後、それをオリゴヌクレオチドの適当な片でプライミング (priming) して、オリゴヌクレオチドの5'-末端が固定化されたDNAの3'-末端へハイブリッド化するようにする。固定化されたDNAの3'-末端は固体の支持体に近接するので、オリゴヌクレオチドの5'-末端もまた固体の支持体に近接し、そしてオリゴヌクレオチドのプライマー (primer) の3'-ヒドロキシル残基はプライマーの伸長のためにいく種類かのDNA合成酵素、例えば、DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼのクレナウ断片または逆トランスクリプターゼにより利用されうるのであろう。プライマーが固定化されたDNAにハイブリッド化された後、それはそれらの酵素および適当なヌクレオシドトリホスフェート基質の使用により伸長されう。酵素反応が終り、そして酵素を洗浄除去した後、溶液を加熱するこ

実施例1

鎌型赤血球貧血の診断用のDNAプローブの大規模生産の目的のDNAの部位特異的固定化

737ヌクレオチド残基を含有するβ-グロビン遺伝子のセグメントをベクターM13mp7中でクローニングした。M13mp7上のクローニング部位は逆転した反復 (inverted repeat) 中に存在するので、それらのクローニング部位は一本鎖M13のDNA中にさえ二本鎖の形態で存在する。この二本鎖部位は適当な制限酵素で消化することができる。挿入されたβ-グロビンの約740残基をもつM13mp7ベクターをまずBamHIまたはEcoRIである制限酵素で消化する。次いで、鎖をゲル電気泳動により分離する。グロビンのインサートを含有する断片を、セファデックスG25上に次の手順により固定化する：

まず、セファデックス粒子を実施例2に記載するようにCNBrで活性化する。737グロビン

インサート含有断片を、基質 (substrate) として ATP を使用して、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼでテイリング (tailing) する。ATP は、リボヌクレオシドトリホスフェートであり、酸化されてジアルデヒドを生成することのできる糖残基を含有する。次いで、これらのジアルデヒド残基を固体の支持体上のアミドと反応させてシッフ塩基を形成し、これを使用して固体の支持体と DNA との間の第二アミン結合を生成することができる。

プローブを固定化した後、19ヌクレオチドを含有するプライマーを固定化した DNA と交雑し、次いでプライマーの伸長を DNA ポリメラーゼ I のクレナウ断片または逆トランスクリプターゼを使用して、後述するようにして、実施する。

実施例 2

アミン (NH_2) 基を含有する固体の支持体の調製

セファデックス G 25 粉末 (0.5 g) を室温

下で、DNA 分子またはオリゴヌクレオチドの 3'-ヒドロキシ末端へ、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼの酵素作用により結合することができる。20 μl の DNA の 737 bp のほぼ 5×10^{-13} モルを 20 μl のカコジル酸カリウム (1 モル、pH 7.2) 中に溶解する。この溶液を 40 μl の蒸留水、5 ~ 20 μl のジチオスレイトール (DTT) (2 ミリモル)、1 ~ 2 μl のリボヌクレオシドトリホスフェート (10 ミリモル) および 50 μl の塩化マグネシウム (20 ミリモル) とともに 37°C に於いて 5 分間インキュベーションする。この反応混合物を引続いて氷浴中で 10 分間冷却する。末端のデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (14 ~ 20 単位) を添加し、そしてこの混合物を 15°C に於いて 24 時間インキュベーションする。修飾された核酸を結合しないヌクレオチドおよび蛋白質からフェノール抽出およびアルコール沈殿により単離することができる。

において 5 ml の蒸留水とほぼ 30 分間混合する。生成物を蒸留水を洗浄し、そして 20 ml の氷冷蒸留水中に再懸濁する。懸濁液を pH 10.5 ~ 11 に 5 モルの水酸化ナトリウムで調節する。懸濁液を氷浴 (4°C) 中で冷却し、そして 1.0 g の固体の臭化シアンを懸濁液に添加する。懸濁液を氷浴中に保持し、そして 30 分間連続的に攪拌する。この期間の間、pH を連続的に監視し、そして 10. ~ 11 に水酸化ナトリウム (5 モル) で維持する。懸濁液を氷冷蒸留水で洗浄し、そしてほぼ 5 ml のヘキサメチレンジアミン (H_2O 中の 1 モル溶液、HCl で pH 9 ~ 10 に処理する。セファデックスのアミン生成物を水または他の適当な緩衝液で、生成物の将来の使用に依存して、洗浄する。

実施例 3

リボヌクレオチドの末端トランスフェラーゼの付加

リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオ

実施例 4

固体の支持体への末端標識核酸の結合

a) シッフ塩基の形成を経る結合

シス-ジオールを過ヨウ素酸塩で酸化してジアルデヒドを形成できることは知られている。これらのジアルデヒドは第一アミン基と -NH_2 の付加を経てシッフ塩基を形成することができる。シッフ塩基は水素化ホウ素ナトリウムで還元して第二アミンを形成することができる。

同様な方法において、3'-ヒドロキシ末端にリボヌクレオチドを含有する DNA (実施例 3) を酢酸ナトリウム緩衝液、0.1 モル、pH 5 中に 1 ミリモルの濃度で溶解する。20 μl のマタ過ヨウ素酸ナトリウム (100 ミリモル) を 1 ml の核酸溶液に添加する。この反応を室温 (25°C) で 40 分間進行させる。この反応に引続いて、pH を水酸化ナトリウム溶液で 8 に調節する。上に記載したようにして調製したセファデックス-アミン (実施例 2) に添加し、適当な緩衝

液、例えば、0.1モルの酢酸ナトリウムpH8中に懸濁する。この反応を室温(25℃)において30分間進行させて、シッフ塩基の懸濁液を形成させる。このシッフ塩基を水素化ホウ素ナトリウムの添加により還元する。還元は次の4工程で実施する：ほぼ0.15mlの新しく調製された水素化ホウ素ナトリウム溶液(200ミリモル)を添加し、そして反応を30分間進行させる。ほぼ0.15mlの水素化ホウ素ナトリウム溶液を再び反応混合物に添加し、そして反応を60分間続ける。他の0.15mlの水素化ホウ素ナトリウム溶液を引続いて反応混合物に添加する。90分後に、0.15mlの水素化ホウ素ナトリウム溶液のアリコートを添加して反応を完結する。この懸濁液を30分間2000gで遠心する。この懸濁液をデカンテーションし、そして3回洗浄する。ペレットを5mlの実施例5におけるようなハイブリダイゼーション緩衝液中に再懸濁する。

実施例6

DNAポリメラーゼ1のクレナウ断片の逆トランスクリプターゼを使用するハイブリダイゼーションプローブの調製

実施例2において生産された固体の支持体上に固定化されたハイブリッドを、50ミリモルのトリス、pH7.2、10ミリモルの硫酸マグネシウム、1ミリモルのジチオスレイトール、50マイクログラム/mlのBSAおよび200ナノモルのデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP、デオキシTTPの各々および、例えば、5単位の逆トランスクリプターゼおよびDNAポリメラーゼのクレナウ断片を含有する緩衝液中に取る。全体の混合物を室温で30分間インキュベーションし、そして反応を上澄み液を遠心し、そして固体粒子を除去することにより停止する。固体粒子を同一緩衝液で洗浄し、そして80%のホルムアミドを固体の支持体から新しく合成したプローブを除去した後、40℃に加熱した。支持体

実施例5

実施例4におけるような固定化された7371ンサートとのオリゴヌクレオチド19A'のハイブリダイゼーション

7371ンサート固定化支持体を、50ミリモルのトリスおよび1ミリモルのジチオスレイトールを含有する緩衝液中に懸濁する。オリゴヌクレオチド19A'、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 278 (1983))、を同一緩衝液中に溶解し、そして懸濁液に添加する。全体の混合物を65℃に加熱し、ゆっくり50℃にする。この混合物を15分間放置し、その時間後それを室温に冷却する。未反応のハイブリット化しないオリゴヌクレオチドを0℃で同一緩衝液で洗浄することにより除去する。固定化された支持体DNAを含有するハイブリッドを15ミリモルのトリス緩衝液、pH7.2で洗浄する。

を水で、次いでトリス緩衝液でよく洗浄し、そしてそれを実施例2および3におけるように再循環する。次いで、合成されたプローブをゲル電気泳動により分析して長さを決定する。

実施例7

M13中のベーターグロビン遺伝子セグメントのクローニング

ベーターヘモグロビン遺伝子をプロパゲーション(propagation)させたファージDNAから分離することができる前記遺伝子の一本鎖セグメントを調製するために、グロブリン遺伝子のほぼ740塩基対のAlu Iのセグメントを二本鎖の複製形態のM13mp7のリンカー区域(linker region)に挿入した。

ファージDNA中に組込まれたリンカー区域は、制限酵素の切離し部位に富んでいるばかりでなく、かつ逆反復であり、そしてそうでなければ一本鎖のファージDNAにおいて二重らせん(duplex)を形成する優先権(priority)

y)を有する。制限酵素は基質として二本鎖DNAを必要とする；こうしてmp7ファージDNAはこの酵素により切離すことができる。異質DNAセグメントを、例えば、Hinc II部位中にクローニングすると、一本鎖ファージDNAのEcoRIまたはBamHIのような酵素による消化、組み換えファージDNAのベクターおよびインサート鎖への分離を可能とし、これらは互いに容易に分離可能である。

ベーターグロビン遺伝子の740bpのAlu Iセグメントは、遺伝子の開始およびその上流のフランク(flanck)の一部からなる。このセグメントは最初にAlu I末端をEcoRI末端に転化し、そしてそのセグメントをpBR322のEcoRI部位中に挿入することによってクローニングした。有用な位置におけるM13mp7中へのEcoRIセグメントの再クローニングは、それがHinc IIで消化されたmp7 DNA中にプラント末端(blunt-end)

で結合されうるように、グロビンセグメントのEcoRI末端の充填(filling-in)を包含した。Hinc II部位における挿入は、インサートが一本鎖組み換えファージDNAからEcoRIまたはBamHI消化により効果的に除去できることを保証した。

クローンにおけるインサートの配向の確立、およびファージにおけるインサート鎖が暗号化(coding)されているか暗号化されていないかを決定することは、制限酵素の消化、および鎖特異的合成プローブのファージDNAへのハイブリダイゼーションにより実現された。

実施例8

実施例6の新しく合成されたプローブを、β-グロビン遺伝子を含むDde I消化核酸の201bp断片とハイブリッド化する。このプローブを、米国特許第4,395,486号に記載されている手順に従い、鎌型(sickle)の正常のβ-グロビンのゲノムDNAにおける消化

のパターンの検出に使用する。

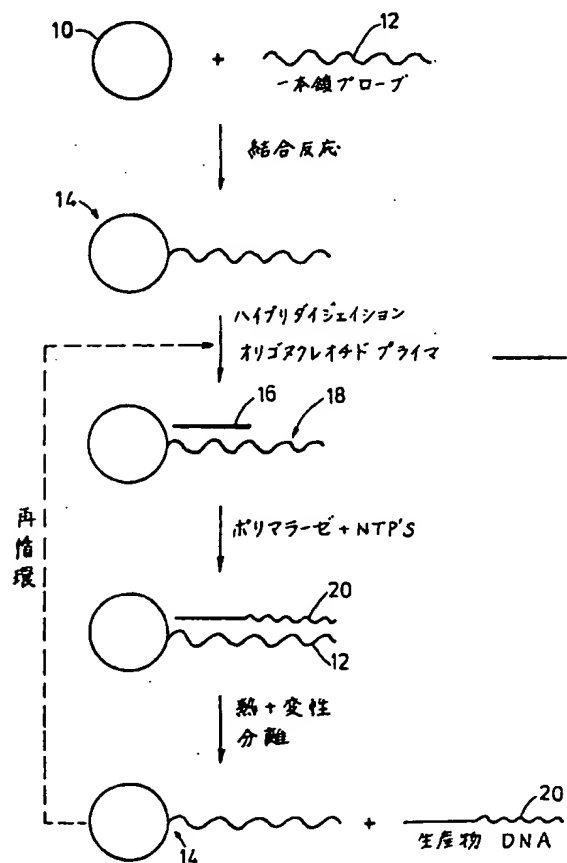
4. 図面の簡単な説明

添付図面は、本発明の好ましい方法のフローシートである。

- 10 固体の支持体
- 12 DNAの鎖
- 14 生産物
- 16 オリゴヌクレオチド
- 18 中間体
- 20 所望の鎖

特許出願人 モレキュラ・ダイアグノスティック
ス・インコーポレーテッド

代理人 弁理士 小田島 平 吉



第1頁の続き

⑤ Int. Cl. ⁴

識別記号

室内整理番号

C 12 Q 1/68
G 01 N 33/50

8213-4B
P-8305-2G

⑦発明者 ドナルド・クロザーズ

アメリカ合衆国コネチカット州06472ノースフォード・サ
レイレイン 8

⑦発 明 者 トマス・バーネツト

アメリカ合衆国コネチカット州06512イーストヘブン・ジ
エフリイロード 27